



TITLE:

〔第2篇〕HONの動物実験ならびに臨床試験(δ -Hydroxy- γ -Oxo-L-Norvaline (HON) の抗結核菌作用に関する研究)

AUTHOR(S):

蒲田, 迪子

CITATION:

蒲田, 迪子. 〔第2篇〕HONの動物実験ならびに臨床試験(δ -Hydroxy- γ -Oxo-L-Norvaline (HON) の抗結核菌作用に関する研究). 京都大学結核研究所紀要 1967, 15(2): 146-156

ISSUE DATE:

1967-03

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/51806>

RIGHT:

δ -Hydroxy- γ -Oxo-L-Norvaline (HON) の 抗結核菌作用に関する研究

〔第 2 篇〕 HON の動物実験ならびに臨床試験

京都大学結核研究所内科学第 1 部（主任 教授 内藤益一）

蒲 田 迪 子

（受付 昭和42年 1 月31日）

第 1 章 結 言

結核化学療法剤としての HON に関する基礎的研究の一環として本論文第 1 篇¹⁾に於いて HON の試験管内実験成績を検討した。その結果 HON の静菌力は使用培地に依って著しく異なるが、0.5 % albumin 加硫安培地では概ね 3.13~6.25 γ /ml 程度の MIC を示し、その静菌力は PZA（薬剤の略号については第 1 篇参照）や sulfa 剤より優れ、VM, CS, EB に匹敵し諸種抗結核薬と交叉耐性のない事を認めた。

以上の実験成績は土屋ら²⁾の報告と略々同様の成績であるが、実際に臨床的に使用し得る可否かを知る為には当然 in vitro に於ける種々の検討がなされねばならぬ。動物治療実験には種々の方法があるが研究室では結核菌感染マウスの延命効果をみる方法³⁾と、海狸ならびに家兎の前眼部結核症を対象として生態のままで病変の経過を観察する方法⁴⁻⁷⁾とが常用されている。又、当研究室では薬剤の吸収、排泄、血中静菌力の推移を検討する簡単な方法として薬剤を生体に投与後採血しその静菌作用を検討する方法が屢々用いられている。即ち1953年我々の研究室の志保田^{8,9)}は薬剤を投与した生体の血清を90%の高濃度血清培地に至る迄の種々の濃度に含ませた Kirchner 培地に於いて結核菌の発育を検索する事に依り、その薬剤の血中に於

ける静菌作用の消長を窺う方法を考案し、其後恒村¹⁰⁾が二、三の改良を加えた。しかし HON の静菌力は一部のアミノ酸に依り拮抗されるから^{11,12)}本剤の検討に際しては Kirchner 培地原液の代りに硫安培地原液を用いるか井本¹³⁾の考案に依る全血培地を用いて血中静菌力を検討する必要がある。

本篇に於いてはマウスを用いて HON の急性毒性実験、及び生存率曲線ならびに平均生存日数を対象とした治療実験を試み、ついで海狸の実験的前眼部結核症に対する治療効果を検討し、一方、家兎を用いて血中静菌力の消長を検索し、更に少数例ながら臨床的に HON 単独投与の成績を吟味したのでそれらの成績を此処に報告する。

第 2 章 動 物 実 験

第 1 節 実験材料

第 1 項 使用動物

1) マウス：体重 20g 前後の dd/Y 系雌性マウスを実験に先だち少くとも 1 週間観察して異常のない事を確かめて実験に供した。

2) 海狸：体重 600g 前後の健康な成熟海狸で Römer 反応陰性であるものを選び一定期間一定条件のもとに飼育し実験に供した。

3) 家兎：体重 3kg 前後の健常白毛赤眼家兎を実験に供した。

第2項 使用菌液

実験により次の4種の菌液を使用した。

1) 人型結核菌黒野株をグリセリンブイヨン培地に3週間培養後その菌膜を釣取、滅菌濾紙により水分を十分に除去しその湿菌量を秤量の後、瑪瑙の鉢で磨砕し約2倍量の乾燥人血漿を加え再び磨砕の後これに滅菌生理的食塩水を加えて5.0 mg/ml 濃度になる様に調製した。

2) 人型結核菌H37Rv株を10%牛血清加Kirchner培地に約10日培養後、菌膜を釣取し滅菌硝子球入りコルペンで手振り法に依り1.0mg/ml 及び 0.02mg/ml 濃度の結核菌生理的食塩水浮游液に調製した。

3) 1%小川培地によく発育した H37Rv 株の菌集落で約 1.0 mg/ml 濃度の石油ベンジン菌液を作成した。

4) Tween-albumin培地に10日間深部均等培養した H37Rv 株の培養液を充分振盪攪拌して菌を分散させ滅菌生理的食塩水で20倍に稀釈した。約 0.2mg/ml 濃度の菌液である。

第3項 使用培地

1) 3%小川培地：成書記載の通りに作成した。

2) 全血培地：血液凝固阻止の目的で 7.0g の磷酸二水素カリ及び 10.0g のクエン酸ソーダを 100.0 ml の滅菌蒸溜水に溶解させた水溶液を予かじめ作成し、全血 1.8ml に対してこの溶液 0.2ml を混合し全血培地とした。1試験管内の培地量は 2.0ml である。

3) 血清加硫安培地：家兎血清に10倍高濃度硫安培地及び滅菌蒸溜水を表1に示した割合に混合して10%血清加硫安培地、30%血清加硫安培地及び50%血清加硫安培地の3種類の培地を作成し実験に供した。

第4項 被検薬液

前篇¹⁾記載の方法に従って滅菌蒸溜水により DHSM 溶液及び HON 懸濁液を作成し実験に供した。

第2節 実験方法並びに実験成績

第1項 HON の急性毒性

実験方法

被検薬液の作成はマウスの体重を略々一定に揃えて、マウス1頭当りの投与量が 0.5 ml になる様に被

検薬液濃度を決めた。予備実験により凡その毒性がわかったので投与薬量を4,000mg/kg から11,000mg/kg 迄の11段階に分け、夫々腹腔内、背部皮下ならびに経口的に投与した。尚、経口投与に際しては 1.0ml「ツベルクリン」用注射器にマウス用ゾンデを装置し胃内に強制的に所定薬液量を注入した。投与48時間後各群の被検動物の死亡数をかぞえ Litchfield Wilcoxon 法¹⁴⁾に依り被検薬物の LD₅₀ を算出した。

実験成績

表は LD₅₀ 算出に必要な群の成績のみを示した。

1) 腹腔内投与に依る HON の急性毒性：成績は表2に示す如く5%の危険率で LD₅₀ を算出すると 5,800mg/kg, その信頼限界は 5,370~6,264mg/kg であった。

2) 皮下投与に依る HON の急性毒性：成績は表3に示す如く5%の危険率で LD₅₀ は 5,800 mg/kg (信頼限界は 5,370~6,264mg/kg) であった。

3) 経口投与に依る HON の急性毒性：成績は表4に示した。5%の危険率で LD₅₀ は 6,400 mg/kg (信頼限界は 5,981~6,848mg/kg) であった。

10,000~11,000mg/kg の HON を与えられたマウスは痙攣、呼吸促迫等の苦悶状態が続いて死亡した。中毒作用発現は投与後1時間で、死亡は投与後比較的早期にみられた。興奮状態、不安状態及び全身硬直等は認めなかった。

第2項 結核菌感染マウスを対象とする HON の延命効果

実験方法

1) 接種方法：実験マウスの尾静脈内に黒野株³⁾の菌液 0.1ml を注入した。接種菌量はマウス1頭当り 0.5mg である。

2) 薬剤投与：10mg/ml 及び 20mg/ml 2種類の HON 溶液並びに対照薬剤として 1.0mg/ml DHSM

表 1 (実験 2) 術 式

培地血清濃度	家兎血清 (ml)	10倍高濃度硫安 培地使用原液量 (ml)	滅菌蒸溜水 (ml)	総培地量 (ml)	菌浮游液 接種量
10%血清加硫安培地	0.1	0.1	0.8	1.0	1滴
30%血清加硫安培地	0.3	0.1	0.6	1.0	1滴
50%血清加硫安培地	0.5	0.1	0.4	1.0	1滴

表 2 HON のマウスに対する急性毒性（腹腔内投与）

投 与 量 (mg/kg)	死亡数/ 使用動物数	死 亡 率(%) (観察値)	死 亡 率(%) (期望値)	観察値-期望値 (絶対値)	x ² の Contribution
4,500	0/10	0(1.3)	4	2.7	0.018
5,000	2/10	20	15	5	0.02
5,500	4/10	40	35	5	0.01
6,000	6/10	60	56	4	0.006
6,500	10/10	100(93.0)	76	17.0	0.16
K=5 使用動物の総和=50 N'=30 自由度 n=3					計 0.214 直線の x ² 0.214×10=2.14 x ² t 7.82 x ² <x ² t 故に Data は有意の 差を示さず
LD ₁₆ = 5,000 mg/kg S = 1.17 LD ₅₀ = 5,800 mg/kg fLD ₅₀ = S ^{2.77/√N'} = 1.08 LD ₈₄ = 6,800 mg/kg					
LD ₅₀ = 5,800 (5,370~6,264) mg/kg S = 1.17 (1.07~1.28) (危険率: 0.05)					R=6,500/4,000 =1.44 A=1.06 fS=A ^{10(K-1)/K√N'} =1.09

備考 K: 薬物投与の数
S: Slope function
N': 期望値で16~84%を示す物の間に使用された動物数の総和
R: 最大投量と最小投量の比
A: SとRより求められる値
fLD₅₀ fS: 夫々 LD₅₀ S 等の factor

表 3 HON のマウスに対する急性毒性（皮下投与）

投 与 量 (mg/kg)	死亡数/ 使用動物数	死 亡 率(%) (観察値)	死 亡 率(%) (期望値)	観察値-期望値 (絶対値)	x ² の Contribution
4,000	0/10	0(0.8)	2.5	1.7	0.012
4,500	1/10	10	10	0	0
5,000	3/10	30	22	8	0.036
5,500	4/10	40	40	0	0
6,000	6/10	60	60	0	0
6,500	10/10	100(93.0)	76.0	17.0	0.21
K=6 使用動物の総和=60 N'=40 自由度 n=4					計 0.258 直線の x ² 0.258×10=2.58 x ² t 9.49 x ² <x ² t 故に Data は有意の 差を示さず
LD ₁₆ = 4,800 mg/kg S = 1.19 LD ₅₀ = 5,800 mg/kg fLD ₅₀ = S ^{2.77/√N'} = 1.08 LD ₈₄ = 6,800 mg/kg					
LD ₅₀ = 5,800 (5,370~6,264) mg/kg S = 1.19 (1.10~1.29) (危険率: 0.05)					R=6,500/4,000 =1.625 A=1.06 fS=A ^{10(K-1)/K√N'} =1.08

表 4 HON のマウスに対する急性毒性 (経口投与)

投 与 量 (mg/kg)	死亡数/ 使用動物数	死 亡 率(%) (観察値)	死 亡 率(%) (期望値)	観察値-期望値 (絶対値)	χ^2 の Contribution
5,000	0/10	0 (0.3)	1	0.7	0.005
5,500	1/10	10	8	2	0.005
6,000	4/10	40	30	10	0.05
6,500	6/10	60	59	1	0
7,000	10/10	100(94.3)	81	13.3	0.11
K=5 使用動物の総和=50 N'=30 自由度 n=3					計 0.17 直線の χ^2 $0.17 \times 10 = 1.7$ $\chi^2 t$ 7.82 $\chi^2 < \chi^2 t$ 故に Data は有意の 差を示さず
LD ₁₆ = 5,800 mg/kg S = 1.15 LD ₅₀ = 6,400 mg/kg fLD ₅₀ = $S^{2.77/\sqrt{N'}} = 1.07$ LD ₈₄ = 7,100 mg/kg					
LD ₅₀ = 6,400 (5,981~6,848) mg/kg S = 1.15 (1.05~1.25) (危険率: 0.05)					R=7,000/5,000 =1.4 A=1.06 fS=A ^{10(K-1)/KV²N'} =1.09

溶液を調製した。薬剤投与は表示の通りで、感染の翌日マウス10頭を1群として4群編成し平均体重に比例し1.0g 当り HON は 0.1 mg 及び 0.2 mg, DHSM は 0.01mg の薬剤投与量 (対照群には生理的食塩水) を 1.0ml 「ツベルクリン」用注射器により1日1回 週6日背部に皮下注射した。投与薬液量はマウス1頭 当り約 0.2ml である。尚、被検薬剤の投与は治療群中のいずれか1群の半数が死亡する迄行ない、それ以後はすべての群の治療を中止した。

3) 延命効果の判定: 生存率曲線と平均生存日数と

の総合判定によった。観察期間は全実験マウスの死亡迄である。

実 験 成 績

実験群は表5に示した。第1群は HON 100 mg/kg, 第2群は HON 200 mg/kg, 第3群は DHSM 10 mg/kg, 第4群は非治療対照群である。

実験群の編成及び各群の平均生存日数を表5に示し、その生存率曲線を図1に示した。図1に

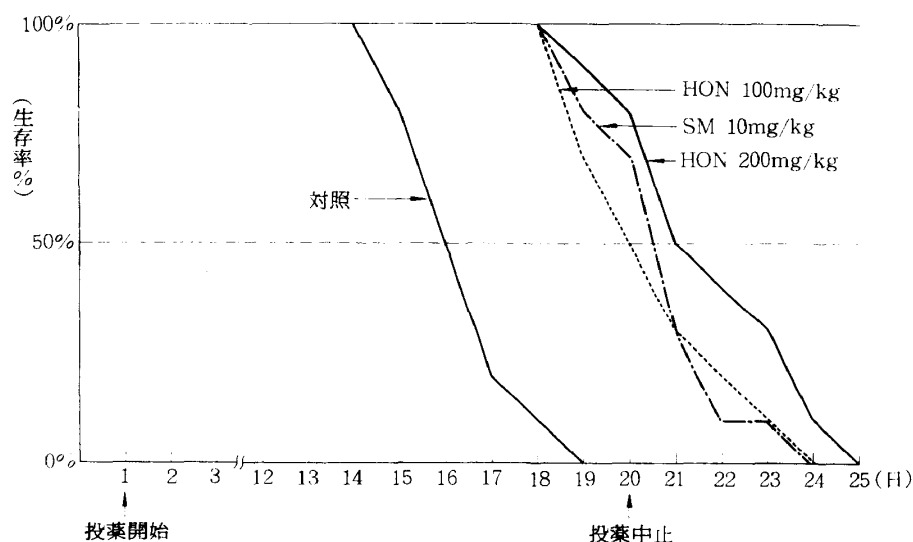


図 1 結核マウスを対象とする HON の延命効果

表 5 実験群の編成と各群の平均生存日数

実験群	動物数	治療の術式及び投与量	平均生存日数
第1群	10	HON 100mg/kg 毎日皮下注射	20.3
第2群	10	HON 200mg/kg 毎日皮下注射	21.5
第3群	10	SM 10mg/kg 毎日皮下注射	20.5
第4群	10	非治療 対照	16.1

よると生存率曲線は対照群, HON 100mg/kg 治療群, DHSM 10mg/kg 治療群, HON 200mg/kg 治療群の順に並び, 対照群に比して治療群はかなりの延命効果を示したが治療群3者間の差は極めて小さい。表5の平均生存日数からみても HON 100mg/kg 治療群は対照に比しその差が4日, HON 200mg/kg 治療群に於いては対照群との差が5日で, マウスの生存日数を対象とする本実験に於いて HON 100mg/kg 及び 200 mg/kg 皮下注射により明らかに治療効果が認められた。

第3項 海狸の実験的前眼部結核症を対象とする HON の治療効果

実験方法

1) 感作接種: 1.0mg/ml の H37Rv 菌液 (生理的食塩水浮游液) の 0.1ml (海狸1頭当り 0.1mg) を実験海狸の右大腿外側皮下に感作接種し, 3週後 Römer 反応の陽転を確認し得たものに対して次に詳述する如く海狸前眼房内に結核菌を接種した。

2) 前眼房内結核菌接種: 感作処置した実験海狸の右眼前房内に 0.02 mg/ml の H37Rv 株の生理的食塩水浮游液 0.05ml (菌量 Ca 0.01mg) を接種した。此の際, 海狸を固定し右眼を最大限に開眼し 0.3% T-Cain 液を点眼し局所麻酔を行なった後, 眼球固定用鑷子で眼球を固定し予かじめ菌浮游液を吸引した「ツベルクリン」注射器 (Mantoux 針を着用) で角膜輪部に近く眼軸に直角の方向に角膜を穿刺し菌液を注入した。

左眼は対照にする為に無処置である。

3) 薬剤投与: 100mg/ml 及び 200mg/ml 2種類の HON 溶液並びに対照薬剤として 20 mg/ml の DHSM 溶液を調製し, 1日1回週6日 (体重 1.0kg 当り 1.0ml の割合) HON は経口的に, DHSM は左大腿皮下に投与した。従って投与量は体重 1.0kg 当り HON は 100mg 及び 200mg, DHSM は 20mg である。尚, 対照群には同量の生理的食塩水を投与し

た。

4) 観察方法: 前眼房内に結核菌を接種した海狸の眼は一時急性反応性炎症を生じ数日後に真の結核性病変を呈しこれが徐々に進展する。その経過観察には内藤式手持角膜細隙灯を用いた。結核病変の程度の判定は Steenken, Wolinsky 及び Heise¹⁵⁾又は Bietti¹⁶⁾が用いた前眼部結核性病変指数を当研究室の河崎¹⁷⁾, 神頭⁷⁾が修正したものをを用いた。各実験群内の動物の病変指数値の相加平均値を其の群の其時に於ける病変指数とし, 病変指数が約3度に達した時に (前眼房内結核菌接種約1週後) 各実験群の指数の平均値が略々等しくなる様に, 表6の如く1群6頭として4群を編成し治療実験を開始した。観察期間は6週, 毎週1回一定の日に観察し病変指数を記録した。

表 6 実験群の編成

実験群	治療の種類及び投与量	使用動物数
第1群	HON 100mg/kg 1日1回経口	6
第2群	HON 200mg/kg 1日1回経口	6
第3群	SM 20mg/kg 1日1回皮下注	6
第4群	対照	6

5) 剖検

治療実験終了後, 実験海狸を1週間無処置に放置, 屠殺し各群より3頭宛無作為的に取出し剖検並びに臓

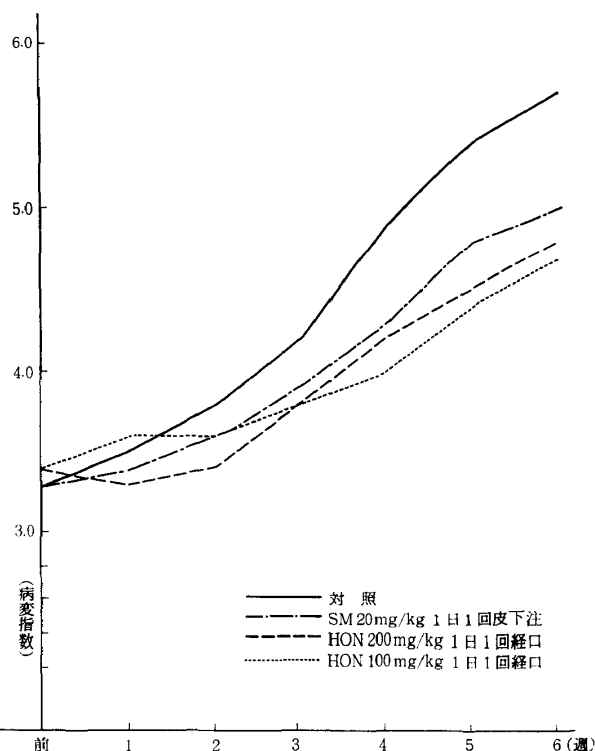


図2 モルモット前眼部結核症治療実験
前眼部病変指数の経過(各群平均)

表 7 前眼部結核性病変指数の経過 (各群平均)

実 験 群	治 療 期 間 (週)						
	治療前	治療後 1 週間	2	3	4	5	6
第1群 HON 100mg/kg 1日1回経口	3.4	3.6	3.6	3.8	4.0	4.4	4.7
第2群 HON 200mg/kg 1日1回経口	3.4	3.3	3.4	3.8	4.2	4.5	4.8
第3群 SM 20mg/kg 1日1回皮下注	3.3	3.3	3.5	3.9	4.3	4.8	5.0
第4群 対照 1日1回生食経口	3.3	3.5	3.8	4.2	4.9	5.4	5.7

表 8 体 重 経 過 (各群平均 単位 g)

実 験 群	治 療 期 間 (週)						
	治療前	治療後 1 週間	2	3	4	5	6
第1群 HON 100mg/kg 1日1回経口	604	616	564	610	604	624	624
第2群 HON 200mg/kg 1日1回経口	628	652	600	600	620	628	668
第3群 SM 20mg/kg 1日1回皮下注	618	625	625	630	603	617	625
第4群 対照 1日1回生食経口	682	692	654	686	660	692	696

表 9 各臓器の肉眼的結核性病変

実 験 群	動物番号	肺		肝		脾		リンパ腺 右鼠蹊
		重量(g)	病 変	重量(g)	病 変	重量(g)	病 変	
第1群 HON 100mg/kg	T 17	12.0	++	45.0	+	5.5	++	++
	T 88	6.0	+	28.0	+	1.2	—	++
	T 38	6.8	++	51.5	++	3.0	±	++
	平 均	8.26		41.5		32.3		
第2群 HON 200mg/kg	T 358	11.0	++	38.0	++	3.6	++	++
	T 97	10.0	++	48.0	++	2.6	++	+
	T 365	9.0	++	45.0	+	2.0	++	+
	平 均	10.0		49.3		2.73		
第3群 SM 20mg/kg	T 328	11.0	+	25.0	—	1.1	—	—
	T 384	6.0	+	32.0	±	1.2	+	—
	T 327	6.5	±	32.0	±	1.6	+	+
	平 均	7.83		29.6		1.9		
第4群 対照	T 261	7.0	++	51.0	++	3.0	++	++
	T 363	7.0	++	37.5	+	7.0	++	—
	T 385	6.0	++	48.0	++	3.3	++	++
	平 均	6.6		45.5		4.43		

註：—：肉眼的に病変がない場合
 ±：結核性病変と思われるが明瞭でない場合
 +：軽度ながら病変の明瞭に認められる場合

++：かなり広範囲に病変がある場合
 +++：臓器のほとんど全部に病変がある場合

器の定量培養を行なった。即ち肺、肝、脾及び腋窩部並びに鼠蹊部のリンパ腺を摘出し、これら内臓諸器管の肉眼的結核性病変を観察記録した。次いで眼球、肝、脾の一組織片(約0.5g)を滅菌乳鉢内で磨碎し、2%

苛性ソーダ液を加えて作成した臓器の10倍稀釈液の0.1mlを3%小川培地斜面に流し、孵卵器中(37°C)に収め8週後に結核菌の発育状態を肉眼的に観察し成績を判定した。

表 10 各臓器内結核菌定量培養成績

実 験 群	動物番号	眼	球	肝		脾	
第1群 HON 100mg/kg	T 17	++	++	C ₁₃	C ₁₃	C ₃₀	C ₁₂
	T 88	++	++	C ₃	—	C ₁	—
	T 38	++	++	C ₃₃	S	C ₁₂	C ₁₁
第2群 HON 200mg/kg	T 358	++	++	+	+	C ₁₀₀	C ₃
	T 97	+++	+++	C ₂₅	C ₃₃	C ₇₂	C ₁₁₀
	T 365	++	++	C ₂₀	C ₁₁	C ₅₉	C ₇₂
第3群 SM 20mg/kg	T 328	++	++	—	C ₁	—	—
	T 384	++	++	C ₂	C ₄	C ₂₄	C ₂₅
	T 327	++	++	C ₄	—	C ₂	—
第4群 対照	T 261	++	++	C ₂₇	C ₅₈	+	+
	T 363	++	++	C ₂	—	+	+
	T 385	+	—	C ₈	C ₁₉	—	C ₁₃₀

註：—：菌発育を認めない場合
 +：培地 $\frac{1}{4}$ 以内に菌発育を認める場合

++：培地 $\frac{1}{4}$ 以上 $\frac{1}{2}$ 以内に菌発育を認める場合
 +++：培地 $\frac{1}{2}$ 以上に菌発育を認める場合

実 験 成 績

各群別の病変指数値の経過を表7及び図2に示した。此の実験は HON 単独経口投与の治療効果を SM 単独皮下注射のそれと比較検討したものであり、SM の5乃至10倍量即ち HON 100 mg/kg 及び 200 mg/kg 治療群が DHSM 20.0 mg/kg 治療群に比し僅かながら優れた成績を収めた。

体重経過は表8の如く各群(治療群、対照群)とも治療開始前より終了時にはいくらか体重が増加し、全期間を通じ著明な変化は認められなかった。

剖検時の肉眼的結核性病変及び各臓器内結核菌の定量培養成績を表9、表10に示した。各臓器の肉眼的結核性病変は DHSM 治療群には治療効果がみられたが、HON 治療群は対照群と殆んど同程度の病変を示した。一方、脾重量は DHSM 治療群が最も少く、HON 200mg/kg 治療群、HON 100mg/kg 治療群、対照群の順に大となった。又、臓器内結核菌定量培養の成績では脾においてのみ治療群と対照群との間に僅かの差違が認められた。

第4項 HON 投与後の家兎に於ける血中静菌力持続時間

実験1 全血培地による Silicone-Coated Slide Culture Methode (SSC 法)¹⁸⁻²²⁾

実 験 方 法

1) 被検薬液投与方法：実験条件を可及的に一定にする為実験中は食餌を与えず、又、薬剤投与は早期空腹時1回内服とし 100mg/ml 濃度の HON 溶液を家兎体重 1.0 kg 当り 1.0 ml 及び 2.0 ml 経口投与した。投与方法は末端に注射器を装置した5号ネラトンカテーテルの先端を胃内に挿入し HON 溶液の所定量を余す事なく注入した。

2) 採血：薬剤投与の直前及び投与後1, 2, 3, 4, 5時間後の6回にわたり、家兎の耳静脈より 2.0ml 宛採血した。

3) 実験手技：採取した家兎血液を用いて全血培地を作成し SSC 法により静菌力を検討した。即ち H37 Rv 株の約 1.0 mg/ml 石油ベンジン菌液を用いて結核菌を吸着させたシリコン被覆スライドを夫々の全血培地に投入し 37°C の孵卵器で2週間培養の後、スライドを培地から採取し生理的食塩水でスライド表面に附着せる血液成分を静かに洗滌し結核菌集落数を肉眼的に判定し易い状態に戻し、対照とせる同一動物の薬液投与前の血液培地のそれと比較し結核菌発育の有無を判定した。

実 験 成 績

実験成績は表11、表12に示した。此の表は菌の発育状態を次の如く表示した。即ち菌集落がスライド全表面に間隙なく発育せる状態を(+++)とし、スライド2/3面積を占める程度の発育を(++)とし、1/3程度を(+)で表現した。発育阻

表 11 HON 100mg/kg 経口投与後の
家兎全血静菌力持続時間

経過時間 家兎番号	注射前	1	2	3	5
I	+++	++	+++	+++	+++
II	+++	++	++	+++	+++
III	+++	+++	+++	+++	+++
IV	+++	+++	+++	+++	+++

判定 培養 2 週後

止効果の基準は菌発育を全く認めぬ場合完全阻止とし(—), 対照より 2 段階低い発育を示した場合を不完全阻止とした。

HON 投与家兎全血の結核菌発育阻止力の持続時間を検討した結果, HON 100 mg/kg 投与時, ならびに HON 200mg/kg 投与時の何れに於いても投与 5 時間迄の血液には対象生体の全例に発育阻止を認めなかった。尚, HON 投与前の全血にも結核菌発育阻止を認めなかった。

実験 2 血清培地による Tween-albumin 菌液 滴下法

実験方法

1) 被検薬液投与方法: 実験 1 と同様にして 100 mg/ml HON 溶液を家兎体重 1.0kg 当り 2.0ml 経口投与した。

2) 採血: 薬剤投与の直前及び投与後 1, 2, 3, 4,

表 12 HON 200mg/kg 経口投与後の
家兎全血静菌力持続時間

経過時間 家兎番号	注射前	1	2	3	5
I	+++	++	++	++	+++
II	+++	++	++	++	+++
III	+++	++	++	++	+++
IV	+++	++	++	++	+++

判定 培養 2 週後

5, 6, 7, 8 時間後の 9 回にわたり, 家兎の耳静脈より 5.0ml 宛採血した。

3) 実験手技: 逐時無菌的に採取した家兎の静脈血を用いて血清加硫安培地を作り静菌力を検討した。即ち採取した血液 5.0ml を硝子キャップ付滅菌遠沈管に採取し, 24 時間静置, 更に約 20 分間 1,500r.p.m. 遠沈して血清を分離し, 採血時間別の夫々の血清を用いて 10%, 30% 及び 50% 血清加硫安培地を作成し, Tween-albumin 菌液 1 滴宛を接種し 2 週間培養後肉眼的に判定した。

実験成績

実験成績は表 13, 表 14 に示した。此の表は菌の発育状態を次の如く表示した。即ち菌の発育を認めない場合を(—)とし, 少量の菌発育を認めた場合を(+), 多量に菌発育を認めた場合及び液面迄菌膜の発育を認めた場合を(++), その

表 13 HON 200mg/kg 経口投与後の家兎血清静菌力持続時間

家兎番号 培地濃度	経過時間	注射前	1	2	3	5
10%血清加硫安培地	I	++	—	—	—	—
	II	++	—	—	—	—
	III	++	—	—	—	—
	IV	++	—	—	—	±
30%血清加硫安培地	I	++	—	—	—	—
	II	++	—	—	—	—
	III	++	—	—	—	—
	IV	++	—	—	—	±
50%血清加硫安培地	I	++	—	—	—	—
	II	++	—	—	—	—
	III	++	—	—	—	—
	IV	++	—	—	—	+

判定 培養 2 週後

表 14 HON 200mg/kg 経口投与後の家兎血清静菌力持続時間

家兎番号 培地濃度	経過時間	注 射 前	1	2	3	4	5	6	7	8
30%血清加硫酸培地	I	++	—	—	—	—	—	+	++	++
	II	++	—	—	—	—	—	+	++	++
	III	++	—	—	—	—	—	+	++	++
	IV	++	—	—	—	—	—	+	++	++
	V	++	—	—	—	—	—	+	++	++

判定 培養 2 週後

中間を(+)で表現した。發育阻止効果の基準は(—)をもって完全阻止とし、対照より弱い發育の場合を不完全阻止とした。

表13に示す如く、HON 200 mg/kg 投与 1 時間後から 3 時間迄は 4 例すべてに完全阻止を認め、5 時間では対象家兎 4 頭中 1 頭に不完全發育阻止を、残りの 3 頭は尚、完全阻止を示した。此の成績からは 10%、30%、50% の血清量の差に依る静菌力の変動は認められなかった。尚、HON 投与前の血清には結核菌發育阻止を認めなかった。以上の実験成績から、HON 200mg/ml 投与時には血清静菌力が 5 時間以上持続する事が明瞭となったので、採血時間を更に延長し HON 投与後 8 時間迄の成績を検討した。その成績は表14に示す如く投薬 5 時間迄の全例に依然完全阻止を認め、投薬 6 時間で全例に不完全阻止を、7 時間に於いて漸く全例に対照に近い發育を認めた。即ち血清静菌力が可成り長時間持続する事が明らかとなった。

第 3 章 臨床投与成績

実験方法

人体に於ける治療成績を検討する為、既往に一次及

び主要二次抗結核薬を長期に使用して尚、喀痰中の結核菌が培養陰性にならなかった肺結核患者（当研究所及び関係諸施設に入院中）6 名を治療対象とし、HON 単独毎日経口投与の治療効果ならびに副作用を検討した。投与量は 1.0g 乃至 2.0g より始め漸増した。

実験成績

治療 3 ヶ月後に於ける胸部レ線所見の改善は認められなかったが、表15に示す如く一時的であったが 6 例中 1 例に喀痰中の結核菌が培養陰性化し、1 例が著明な減少を示した。一方、HON 投与開始後間もなく全身衰弱の為死亡した 1 例を除き最高 1 日量 12.0g 迄服用可能であった。尚、自他覚的に副作用を全く認めていない。

第 4 章 総括並びに考按

著者は dd/Y 系雌性マウスを用い HON の急性毒性実験を行なった。Litchfield & Wilcoxon 氏法¹⁴⁾に依り LD₅₀ を算出し、腹腔内及び皮下投与の何れの場合にも 5,800mg/kg、経口投与の場合は 6,400mg/kg の値を得た。土屋ら²⁾によると静脈内注射で 5,200 mg/kg、皮下注射で 8,000 mg/kg、経口投与で 7,600mg/kg であり、

表 15 HON 単 独 臨 床 投 与 成 績

患者名	投 与 方 法	投与期間	結 核 菌 培 養 所 見		X線所見 治 療 後	副 作 用
			治 療 前	治 療 後		
Y. N.	2 g → 3 g	2 ヶ月	++	++	不変	なし
T. Y.	2 g → 12 g	3 ヶ月	++	—	〃	〃
K. S.	3 g → 6 g	3 ヶ月	++	++	〃	〃
T. A.	5 g → 7 g	3 ヶ月	++	+	〃	〃
H. I.	2 g → 8 g	3 ヶ月	++	++	〃	〃
S. Y.	2 g → 3 g	投与 1 週間後に全身衰弱の為死亡				

著者の成績と略々同様ある。即ち HON の急性毒性は極めて弱く、経口投与と皮下投与の毒性は近似の値を示す。

又、急性毒性発現の状態をみると HON 10,000 ~ 11,000mg/kg 皮下及び経口投与群の全例が2時間以内に死亡した。即ち急性中毒死の場合にも経口投与と皮下投与に於いて著差を認めない点、HON は腸管吸収の良好なる薬剤であると言える。

次に、マウスの生存日数を指標として HON の治療効果を検討した結果、HON 100 mg/kg 毎日皮下注射は DHSM 10 mg/kg と略々同様の効果を、HON 200mg/kg 毎日皮下注射はそれより少々優れた生存率を示したが3者間の差違は極めて小さい。

一方、海猿の前眼部結核症を対象として HON の治療効果を検討した場合には前眼部結核症に対して DHSM 20 mg/kg, HON 100 mg/kg, 同じく 200 mg/kg の3種とも略々同様の治療効果を示した。脾重量に於いては DHSM が最も優れ HON 200 mg/kg, 次いで 100 mg/kg 及び対照の順となった。即ち前眼部結核症では HON が DHSM に劣らぬ治療成績を示し、臓器内の結核病変に於いては HON より DHSM が優れている現象がみられた。この原因は明らかでないが興味深いものがある。土屋²⁾らはマウス及び海猿の実験的結核症に於いて皮下注射と経口投与の何れにも同程度の治療効果を示した事から長期間薬剤の投与を必要とする抗結核薬として極めて有利であると述べ、更に海猿実験結核症で HON 1日量 100mg/guinea pig. が DHSM 1日量 5mg/guinea pig. に相当する治療効果を得たと述べている。この HON 投与量を体重 50kg の健康成人に換算すると1日約 10g の投与量に相当する。

次に家兎に於ける HON 投与時の静菌力持続時間をみると全血の静菌力は投与後5時間迄全例に発育阻止を認めなかった。これに反し血清を分離しこれを30%の割合に硫安培地に加えて静菌力の推移をみた場合には経口投与5時間後でも大半が完全阻止を示した。かように全血培地では血清含有量が高度であるにもかかわらず

血中静菌力が弱く且、持続時間が短かい成績を呈した事は第1篇¹⁾表6に示した如く、培地中の血清濃度が増加するに伴って HON 静菌作用が著るしく低下する事に依るのであろう。即ち10%血清加硫安培地での MIC は 3.13 γ /ml であるが全血清培地では 125 γ /ml となり静菌力が 1/40に減弱する。換言すれば全血清培地の測定限界濃度が10%, 30%及び50%血清加硫安培地の測定限界濃度よりも40倍、20倍及び10倍大きい事を意味する。金沢ら¹¹⁾は血中濃度の持続はかなり良好で 100mg/kg HON 皮下注射に依る場合は1時間後に最高濃度 177 γ /ml に達し、5時間後には 4 γ /ml と速やかに低下するが、経口投与の場合は徐々に血中濃度が高まり2時間後に最高濃度 120 γ /ml に達し、5時間でも尚 73 γ /ml の濃度を保持し、かなり長時間持続したと述べている。

著者は一次及び二次抗結核薬の長期使用で菌陰性を達成し得ぬ肺結核患者6名に対して試験的に HON を投与した。最初、副作用を考慮して1日 1.0~2.0g の投与量で開始し 12.0g 迄漸増したが副作用と思われる症状を認めなかった。又、6名中1名が一時的ではあったが培養陰性化した。此の症例は1日 12.0g 迄増量した患者であった。HON の in vitro の静菌力はかなり強く VM, EB に匹敵するが、その静菌作用は一部のアミノ酸及び鉄化合物に拮抗され^{11,12)}生体内に於いてはかなり減弱するものと想定される。事実、50%血清加硫安培地での MIC は 12.5 γ /ml, 50%血清加 Kirchner 培地で 62.5 γ /ml, 90%血清加硫安培地での MIC は 62.5 γ /ml, 90%血清加 Kirchner 培地で 125 γ /ml であって、この成績をみても生体内効果はさほど期待出来ぬであろうと予想される。6例の HON 臨床実験のうち菌陰性化をみたのは1日量12.0g投与例であった事は、動物実験に於ける 100~200mg/kg の投与量が体重 50kg の人体の1日 10g 投与に相当する事を想起せしめる。換言すれば臨床的に1日 10g を投与すれば或程度の効果が期待出来るのではないかと考える。此の場合に先づ問題となるのは副作用であるが HON 経口投与に於けるマウス LD₅₀ は 6,400

mg/kg で毒性が著るしく低く、又、甚だ少数の臨床実験であるが1日量 12.0g 内服で自他覚的に副作用と思われる所見を認めなかった点、本剤は PAS の如くかなり大量の継続投与が可能であり且、必要であろうと考えられる。

HON の治療効果は 200mg/kg の投与量に於いてさえ DHSM 20 mg/kg 投与にさ程勝るものではないが、この程度の抗結核性を有する HON でも副作用が少なく他剤との交叉耐性を有しない点等から、一次薬剤はもとより二次薬剤にも耐性を示す肺結核患者が増加しつつある現在の結核治療に利用出来る面もあるのではないかと考える。

かつて著者の研究室に於いて内藤²³⁾が抗結核薬として殆んど注目されなかった sulfa 剤を INH の併用剤として利用する事を見出した如く、HON も亦、結核治療の主剤とはなり得ぬ迄も併用剤として第三次化学療法剤の一つとして利用し得るのではなかろうか。この点に関して最も重要な問題は、HON と他の抗結核薬殊に現在比較的使用頻度の少ない薬剤である EB, DAT 及び VM 等との併用効果の検討であろうと思われる。

第5章 結 論

HON 単独で動物実験及び臨床試験を試み次の結論を得た。

1) 健常マウスを対象とした急性毒性試験に於いて腹腔内投与及び皮下投与に依る LD₅₀ はともに 5,800 mg/kg, その信頼限界が 5,370 ~ 6,264 mg/kg, 経口投与に依る LD₅₀ は 6,400 mg/kg, その信頼限界が 5,981 ~ 6,848 mg/kg で、HON の急性毒性は極めて弱い。

2) マウスの実験的結核症を対象としての HON 100mg/kg 毎日皮下注射は DHSM 10mg/kg 毎日皮下注射と同様の治療効果を示した。

3) 海猿の前眼部結核症を対象とした HON 100mg/kg 及び 200 mg/kg 毎日経口投与実験でも HON は DHSM 200mg/kg に略々匹敵する治療効果を示した。

4) HON 200 mg/kg 経口投与後の家兎血中静菌力は5時間迄認められた。

5) 6名の肺結核患者を対象として HON 1日量 12.0g 迄の単独経口投与を試み全例に副作用を認めず、且1例は喀痰中結核菌が培養陰性化した。

謝辞：稿を終るに臨み御指導を賜りました前川暢夫助教授、吉田敏郎博士、津久間俊次博士をはじめ当研究室の各位に深く感謝の意を捧げます。

文 献

- 1) 蒲田迪子：本論文第1篇
- 2) 土屋皖司，他：武田研究所年報，22：148，昭和38年
- 3) 浜田浩司：京大結研紀要，7-2増刊：315，昭和35年
- 4) 内藤益一，他：京大結研年報，2：1，昭和26年
- 5) 前川暢夫：京大結研紀要，1：29，昭和28年
- 6) 日根野吉彦：京大結研紀要，4：130，昭和30年
- 7) 神頭勝太：胸部疾患，1：250，昭和32年
- 8) 志保田明：京大結研紀要，1：140，昭和27年
- 9) 志保田明：京大結研紀要，1：135，昭和28年
- 10) 恒村俊郎：京大結研紀要，7-3増刊3：338，昭和34年
- 11) Kanazawa, K., et al: Amer. Rev. Resp. Dis., 81:924, 1960
- 12) 土屋皖司：武田研究所年報，22：167，昭和38年
- 13) 井本伍平：京大結研紀要，7-3増刊3：306，昭和34年
- 14) Litchfield, J.T. & Wilcoxon, F.: J. Pharmacol., 96:99, 1949
- 15) Steenken, Wolinsky & Heise: Amer. Rev. Tuberc., 53:175, 1946
- 16) G.B. Bietti: Arch. Oph., 43:431, 1950
- 17) 河崎弘：京大結研紀要，5：129，昭和32年
- 18) 東向一郎：京大結研紀要，7-3増刊1：461，昭和34年
- 19) 東向一郎：京大結研紀要，7-3増刊1：468，昭和34年
- 20) 東向一郎：京大結研紀要，7-3増刊2：22，昭和34年
- 21) 内藤益一，他：京大結研紀要，12：112，昭和39年
- 22) Higashi, K., et al: Amer. Rev. Resp. Dis., 85：392, 1962
- 23) 内藤益一，他：結核，31増刊：319，昭和31年